

Prodn. of cytokine mixt. for use in cancer therapy

Patent Number: DE19506362
Publication date: 1996-08-29
Inventor(s): KIRCHNER HARTMUT DR (DE); ATZPODIEN JENS DR DR (DE)
Applicant(s): KIRCHNER HARTMUT DR (DE); ATZPODIEN JENS DR DR (DE)
Requested Patent: ☐ DE19506362
Application Number: DE19951006362 19950224
Priority Number(s): DE19951006362 19950224
IPC Classification: A61K38/19; A61K38/20
EC Classification: A61K35/14, C07K14/52, C12N5/06B10, A61K38/19
Equivalents:

Abstract

Prodn. of cytokine mixts. comprises: (a) isolating peripheral blood mononuclear (PBM) cells from whole human blood, (b) incubating the PBM cells with monoclonal antibody OKT3, (c) collecting the culture supernatant, and (d) adding interleukin-2 (IL-2) to the supernatant. Also claimed are cytokine mixts. produced as above.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Off nlegungs chrift
⑩ DE 195 06 362 A 1

⑤① Int. Cl.⁸:
A 61 K 38/19
A 61 K 38/20

②① Akt nzeichen: 195 06 362.7
②② Anmeldetag: 24. 2. 95
④③ Offenlegungstag: 29. 8. 96

DE 195 06 362 A 1

⑦① Anmelder:
Atzpodien, Jens, Dr. Dr., 30559 Hannover, DE;
Kirchner, Hartmut, Dr., 30627 Hannover, DE

⑦④ Vertreter:
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

⑥⑥ Entgegenhaltungen:
OSBAND, M.E. et al.: The Lancet 335 (1990),
S. 994-998;
Datenbank JICST-EPlus AN 920331996;
WATANABE, H., et al.: Biotherapy (Tokyo) 6, (1992),
S. 439-440;
Datenbank JICST-EPlus AN 930634033;
WATANABE, H., et al.: Nippon Rinsho Men
eki Gakkai Kaishi (Japanese Journal of Clinical
Immunology) 16 (1993) » 216-226;

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Multi-Cytokin-Mischung und daraus hergestelltes Arzneimittel zur Behandlung maligner Erkrankungen

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft eine Multi-Cytokin-Mischung erhalten durch Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen aus humanem Vollblut und Inkubation mit OKT-3, wobei nach Abtrennung des Kulturüberstandes Interleukin-2 (IL-2) zugegeben wurde. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird ferner ein Verfahren zur Herstellung dieser Multi-Cytokin-Mischung beschrieben sowie die Verwendung zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung maligner Erkrankungen, bei der man die zusätzlich IL-2 enthaltende Multi-Cytokin-Mischung vor der Verabreichung entweder mit patienteneigenem Vollblut oder daraus isolierten peripheren mononukleären Blutzellen inkubiert.

DE 195 06 362 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Multi-Cytokin-Mischung erhalten durch Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen aus humanem Vollblut und Inkubation mit OKT-3, wobei nach Abtrennung des Kulturüberstandes humanes Interleukin-2 (IL-2) zugegeben wurde. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird ferner ein Verfahren zur Herstellung dieser Multi-Cytokin-Mischung beschrieben sowie die Verwendung zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung maligner Erkrankungen, bei der man die zusätzlich IL-2 enthaltende Multi-Cytokin-Mischung vor der Verabreichung entweder mit patienteneigenem Vollblut oder daraus isolierten peripheren mononukleären Blutzellen inkubiert.

Die Tumor-Therapie unter Verwendung von Cytokinen als Botenstoffe der Körperabwehr hat seit Mitte der achtziger Jahre zu wesentlichen Fortschritten bei der Krebsbehandlung beigetragen. Die therapeutische Anwendung der im Körper natürlich vorkommenden Cytokine ermöglicht zum einen eine differenzierte Modulation der menschlichen Immunfunktionen zur Tumoralabwehr, zum anderen werden durch die Cytokin-Therapie die bei der konventionellen Chemo- und Strahlentherapie beobachteten Nebenwirkungen wie Haarausfall, Schleimhautschäden usw. vermieden.

Seit Einführung der ersten rekombinanten, d. h. künstlich auf gentechnologischem Wege hergestellten menschlichen Cytokine, sind positive Ergebnisse sowohl mit Einzelsubstanzen als auch mit Kombinationen mehrerer Cytokine gesammelt worden. Als Beispiele werden die Interferon-Behandlung und die Interferon/Interleukin-2-Therapie verschiedener Tumoren, wie maligne Melanome, Nierenzellkarzinome, colorektale Tumoren und Lymphome, genannt.

Der Einsatz spezifischer Mischungen natürlicher Cytokine in der Tumor-Therapie ermöglicht erstmals die gezielte Stimulation patienteneigener Blutzellen. Präklinische und klinische Untersuchungen weisen darauf hin, daß die gleichzeitige kombinierte Gabe unterschiedlicher Botenstoffe der Körperabwehr, wie Tumor-Nekrose-Faktor, Interleukine, Interferone und kolonie-stimulierende Faktoren, eine wesentlich intensivierte biologische Tumor-Therapie ermöglicht (M.E. Osband et al., Lancet 335 (1990) 994—998).

So wirkt beispielsweise Interferon- γ direkt antiproliferativ auf Krebszellen, und es kann darüber hinaus die Sekretion anderer antitumoraler Cytokine, u. a. Interleukin-2, stimulieren und die Expression von tumorassoziierten und HLA-Antigenen auf malignen Zellen verstärken (P. von Wussow et al., Cancer 61 (1988) 1071—1074; E.C. Borden, Clin. Immunol. Immunopathol. 62 (1992) 18—24; R. Landmann et al., J. Interferon Res. 12 (1992) 103—111). Tumor-Nekrose-Faktor- α und - β bewirken eine direkte Cytostase von Tumorzellen, die auch in synergistischer Verbindung mit Interferon- γ beobachtet werden kann. Zusätzlich können TNF- α und TNF- β die Freisetzung multipler sekundärer Cytokine, darunter Interferon- γ sowie kolonie-stimulierende Faktoren, induzieren (D. Lienhard et al., World J. Surgery 16 (1992) 234—240; G. Trinchieri, Immunol. Ser. 56 (1992) 289—313; K.J. Tracy und A. Cerami, Crit. Care Med. 21 (1993) 415—422; B. Bonavida, Biotherapy 3 (1991) 127—133). Die kolonie-stimulierenden Faktoren G-CSF und GM-CSF können neben ihrer wachstumsfördernden Wirkung auf Knochenmark-Stammzellen in der Tumor-Therapie auch als Adjuvantien eingesetzt werden. In dieser Funktion verbessern sie vor allem die Immunogenität von Tumorzellen, z. B. in Verbindung mit der Applikation von Tumorstoffen (G.D. Demetri und K.H. Antman, Semin. Oncol. 19 (1992) 362—385).

Nach der in Fachkreisen vorherrschenden Meinung kann die durch rIL-2 alleine bewirkte Induktion einer Anti-Tumor-Immunität eine wichtige Rolle in der Krebstherapie spielen. Obwohl bereits einige positive therapeutische Resultate mit IL-2 erzielt wurden, waren diese mit einer Vielzahl von auf IL-2 zurückzuführenden nicht-spezifischen Wirkungen assoziiert (M.T. Lotze, Cancer 58 (1986) 2764—2772). Im Hinblick auf die beobachtete Toxizität herrschen in der Fachwelt verschiedene Auffassungen vor, die auf die Art der Verabreichung von IL-2 gerichtet sind. Während in den frühen Jahren der IL-2-Therapie das Cytokin überwiegend intravenös (i.v.) verabreicht wurde, wurden in jüngeren klinischen Untersuchungen Therapie-Pläne mit einer subkutanen (s.c.)-Injektion, oftmals in Kombination mit rekombinantem humanem Interferon, angewandt. Bei Patienten mit metastatischen Nierenzellkarzinomen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen einer intravenösen und subkutanen Behandlung im Hinblick auf die beobachteten Ansprechraten festgestellt. Jedoch führte die subkutane Gabe von IL-2 zu objektiven Tumorrückbildungen bei IL-2-Dosen, die um einen Faktor 10 bis 30 unterhalb der maximal tolerierten Dosis lagen (J. Atzpodien, H. Kirchner et al., Lancet 335 (1990) 1509—1512).

Die Ergebnisse von Rosenberg et al. im Hinblick auf die Verwendung von rIL-2 und die Therapie mit Lymphokin-aktivierten Killerzellen (S.A. Rosenberg et al., JNCI 85 (1993) 622—632) deuten zwar auf verbesserte Ansprechraten hin, jedoch wurden zum Teil erhebliche Nebenwirkungen beobachtet, die auf die Verwendung von IL-2 zurückzuführen waren.

In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß eine Autolymphozyten-Therapie die Überlebensraten bei Patienten mit metastasierten Nierenzellenkarzinomen erhöhen und gleichzeitig eine gute Lebensqualität erhalten kann (M.E. Osband et al., Lancet 335 (1990) 994—998). Der entscheidende Nachteil der Autolymphozyten-Therapie, bei der der bislang die Routineanwendung bei der Krebsbehandlung verhindert hat, liegt in der zeitaufwendigen in vitro-Kultivierung konventioneller Lymphokin-aktivierter Killerzellen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Arzneimittel zur Verfügung zu stellen, das die Vorteile einer Autolymphozyten-Therapie mit den positiven Wirkungen von IL-2 verbindet. Gegenüber Mitteln im Stand der Technik soll die auf IL-2 zurückzuführende Toxizität bei dem erfindungsgemäßen Arzneimittel deutlich reduziert sein. Das Arzneimittel soll ferner auf einfache Weise herstellbar sein, um eine routinemäßige Anwendung in der klinischen Krebstherapie zu ermöglichen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch eine Multi-Cytokin-Mischung gelöst, die durch Inkubation von aus humanem Vollblut isolierten peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC, Monozyten) mit dem monoklonalen Antikörper OKT-3 und Zugabe von humanem Interleukin-2 (IL-2) zum Kulturüberstand (LCM, lymphocyte-conditioned medium) erhalten wird.

Diese Multi-Cytokin-Mischung wird zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung maligner Erkrankungen verwendet, das eine Kombination der Multi-Cytokin-Mischung mit aus dem Vollblut des zu behandelnden Patienten ("patienteneigenes Vollblut") isolierten peripheren mononukleären Blutzellen sowie gegebenenfalls geeignete pharmazeutische Hilfs- und Trägerstoffe enthält, wobei die Mischung und die mononukleären Blutzellen vor der Verabreichung inkubiert wurden. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Multi-Cytokin-Mischung verwendet, um das Vollblut des zu behandelnden Patienten zu inkubieren, ohne die peripheren mononukleären Blutzellen zu isolieren. Es hat sich dabei in der Praxis bewährt, Blutkonservenbeutel mit CPDA-1 Stabilisator, Heparin nov oder ähnlichem zur Inkubation zu verwenden.

Unter der Behandlung maligner Erkrankungen werden in diesem Zusammenhang die Behandlung von Erkrankungen, bei denen sich maligne Primärtumoren gebildet haben, die Behandlung von Metastasen sowie präventive Behandlungen zur Verhinderung der Metastasenbildung nach (operativer) Entfernung maligner Tumoren (adjuvante Behandlung) verstanden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann entweder aus natürlichen Quellen isoliertes oder rekombinant hergestelltes IL-2 eingesetzt werden. Die Multi-Cytokin-Mischung, der weitere, vorzugsweise rekombinant hergestellte Cytokine aus der Gruppe bestehend aus Tumor-Nekrose-Faktoren, Interleukinen, Interferonen und kolonie-stimulierenden Faktoren zugegeben werden können, wird gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung bis zur weiteren Verwendung im Rahmen der Anti-Tumor-Therapie tiefgefroren oder gefriergetrocknet.

Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung werden die peripheren mononukleären Blutzellen zur Herstellung einer (autologen) Multi-Cytokin-Mischung aus dem Vollblut des zu behandelnden Patienten isoliert.

Das Arzneimittel der vorliegenden Erfindung wird im Rahmen der Behandlung maligner Erkrankungen entweder systemisch oder lokal appliziert.

Ein wesentlicher Vorteil der IL-2 enthaltenden autologen Multi-Cytokin-Mischung bei der Inkubation von Vollblut des zu behandelnden Patienten oder daraus isolierten peripheren mononukleären Blutzellen ist die mit 4 Stunden gegenüber der aus dem Stand der Technik bekannten Inkubation von Autolymphozyten (M.E. Osband et al., Lancet 335 (1990) 994—998) deutlich kürzere Stimulationsdauer. Damit steht erstmals ein Arzneimittel zur Verfügung, das im Rahmen der Behandlung maligner Erkrankungen ohne großen technischen und zeitlichen Aufwand hergestellt und mit Erfolg eingesetzt werden kann.

Durch die extrakorporale Stimulation patienteneigener Lymphozyten kann im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Mischung natürlicher (autologer) Cytokine gewonnen werden, die die wesentlichen anti-tumoral wirksamen Cytokine in einer im Vergleich zum Blutserum 100- bis 4000fach angereicherten Konzentrationen enthält (vgl. Tabelle 1).

Bei der Inkubation von isolierten peripheren mononukleären Blutzellen oder Vollblut mit der autologen Multi-Cytokin-Mischung in Gegenwart von IL-2 wird eine deutlich bessere Stimulation erreicht als mit Interleukin-2 alleine. Die oben genannte Multi-Cytokin-Mischung (LCM) ohne Interleukin-2 bewirkt ebenfalls nur eine sehr viel geringere Stimulation.

Es wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung überraschenderweise festgestellt, daß insbesondere durch die Inkubation von patienteneigenem Vollblut mit einer IL-2 enthaltenden Multi-Cytokin-Mischung ein Arzneimittel zur Verfügung gestellt wird, das bei der Tumorbehandlung zu einer signifikant erhöhten und Tumor-spezifischen zellulären Immunität führt, die bei Autolymphozyten-Therapien im Stand der Technik bislang nicht beobachtet wurde. Nach der Inkubation der IL-2 enthaltenden Multi-Cytokin-Mischung mit patienteneigenem Vollblut wird das Arzneimittel dem Patienten entweder systemisch oder lokal appliziert.

Obwohl der Mechanismus dieser synergistischen Wirkung bei der Verwendung von Vollblut bislang nicht geklärt ist, scheint die Verstärkung der cytolytischen Aktivität der durch LCM/IL-2 aktivierten Killerzellen auf zusätzlich vorliegende Aktivierungssignale, auf die Einbindung weiterer Zellpopulationen mit cytolytischer Funktion und auf die Sekretion sekundärer Cytokine zurückzuführen zu sein. Die Verwendung von Vollblut anstelle aufgereinigter Lymphozyten hat offensichtlich den Vorteil, daß nicht-lymphozytäre Zellbestandteile wie z. B. Granulozyten und Monozyten zusätzlich aktiviert werden und die therapeutische Wirksamkeit des Arzneimittels stark erhöhen. Durch die Vielzahl der zugesetzten autologen Cytokine kann im Vollblut somit eine wesentlich breitere zelluläre und humorale Aktivierung erzielt werden als bei Verwendung aufgereinigter Lymphozyten.

Der systemisch adoptive Transfer des aus der Interleukin-2 enthaltenen Multi-Cytokin-Mischung und Vollblut bestehenden Arzneimittels führte bei Patienten mit metastatischen Nierenzellkarzinomen in 6 von 8 Fällen zu einem objektiven Ansprechen des Tumors, wobei eine Verlängerung der Überlebenszeit von 14 und mehr Monaten beobachtet wurde. Die Sicherheit und Verträglichkeit des Arzneimittels war sehr gut und ermöglichte eine ambulante Therapie. Die aus dem Stand der Technik in Verbindung mit der Verwendung von IL-2 bekannten, zum Teil drastischen Nebenwirkungen wurden bei dem erfindungsgemäßen Arzneimittel nicht beobachtet.

Für eine Behandlung mit dem erfindungsgemäß aus der IL-2 enthaltenden autologen Multi-Cytokin-Mischung durch Inkubation mit Vollblut erhaltenen Arzneimittel kommen potentiell alle malignen Erkrankungen, d. h. alle Krebsarten, in Frage, bei denen sich immunmodulierende Therapiemodalitäten als wirksam erweisen. Vorzugsweise handelt es sich aber bei dem zu therapierenden Krebs um Nierenzellkarzinome und das maligne Melanom.

Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen beschrieben.

Beispiele

A. Material und Methoden

1. Patienten

Insgesamt 8 Patienten erhielten mit einer IL-2 enthaltenden Multi-Cytokin-Mischung inkubiertes Vollblut [im
folgenden als SHAK-Zellen (Sh rt-activated killer cells) bezeichnet] als kontinuierliche intravenöse Infusion von
5 3×10^7 Zellen/ m^2 über einen Zeitraum von 1 Stunde. Die Applikation wurde für 4 Wochen 3 × wöchentlich
fortgeführt. Alle Patienten wiesen ein fortgeschrittenes Stadium eines metastasierten Nierenzellkarzinoms auf,
und andere systemische Therapien erwiesen sich vor der Behandlung mit den SHAKs als ineffektiv. Zur
Risikofaktor-Analyse überlebender Patienten wurde eine Multivariatanalyse ("multivariate Cox proportional
hazards regression model") verwendet (J. Atzpodien, H. Kirchner, Semin. Oncol. 6 (1993) 22–26). Die folgenden
10 unabhängigen Prognosevariablen wurden ermittelt:

Erythrozyten-Sedimentations-Geschwindigkeit > 70 mm/1 Stunde und Lactatdehydrogenase > 280 U/l als
Haupttrisikofaktoren; Hämoglobin > 100 g/l, Zahl der neutrophilen Granulozyten $> 6000/\mu l$ und extrapulmonäre
metastatische Krankheit als geringere Risikofaktoren. Basierend auf der Risikofaktor-Verteilung von 279
zuvor behandelten Patienten mit metastatischen Nierenzellkarzinomen wurden die Patienten drei Gruppen
15 zugeteilt: (A) geringes Risiko, d. h. Abwesenheit sämtlicher Risikofaktoren; (B) mittleres Risiko, d. h. einen
Hauptfaktor und 2 geringere oder 3 geringere und kein Haupttrisikofaktor; (C) hohes Risiko, d. h. ein Risikoprofil,
das die Gruppen A und B übersteigt. Die Überlebensrate der Patienten wurde vom Beginn der Therapie an
gemäß der Kaplan-Meier-Abschätzung berechnet.

Im Anschluß an die Therapie wurde der Tumorstatus erneut gemäß den WHO-Kriterien eingeschätzt. Eine
20 systemische Toxizität von Grad III und IV WHO führte zu einer 50%igen Reduktion der Dosis bzw. zu einem
Abbruch der Behandlung.

Vor der Behandlung wurde im Rahmen einer Nephrektomie bei allen Patienten der Primär-Tumor reseziert.
Zur in vitro-Verwendung wurden diese Tumorproben unter stabilen Bedingungen zerkleinert und in gleichen
Anteilen zu 10^7 Zellen pro ml in 90% fötalem Kälberserum (FCS, Technomara) und 10% Dimethylsulfoxid
25 (DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) eingefroren.

2. Herstellung einer autologen Multi-Cytokin-Mischung (LCM)

OKT-3, ein mitogener monoklonaler Antikörper, der gegen den nicht-spezifischen Antigen-Teil des T-Zell-
30 Rezeptorkomplexes gerichtet ist (J.D. Ashwell et al., Science 237 (1987) 61), wurde von Ortho Diagnostic Systems
(Raritan, N.J., USA) erhalten. OKT-3 wurde in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) auf eine Endkonzentration
von 1 $\mu g/ml$ verdünnt und für 18 Stunden bei 4°C Gewebekulturflaschen zugegeben (J.R. Yanelli et al., J.
Immunol. Methods 144 (1990) 91–100; F.C. Garbrecht et al., J. Immunol. Methods 107 (1990) 137–142). Nach der
Inkubation wurden die Kulturbehälter mit PBS gewaschen, um ungebundenen OKT-3 zu entfernen. Die periphe-
35 ren mononukleären Blutzellen (PBMC) wurden durch Cytozentrifugation von heparinisiertem venösem Blut
über Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Piscataway, N.J., USA) hergestellt und den OKT-3-beschichteten Kulturbehäl-
tern in einer Menge von 6 Zellen/ml zugegeben. Nach 72 Stunden Inkubation bei 37°C wurde der zellfreie
Überstand gesammelt, durch ein 0,45 μm -Filter geleitet und bei $-75^\circ C$ bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3a. Inkubation von PBMC mit LCM/IL-2; Erzeugung von SHAK

PBMC wurden wie unter Punkt 2 beschrieben isoliert und in einer Konzentration von 106 Zellen/ml vollstän-
digem Kulturmedium zugegeben, das 100 IU/ml IL-2 (EuroCetus, Amsterdam, NL) und 25% LCM enthielt. Die
Zellen wurden für 4 Stunden inkubiert und dann gründlich gewaschen, um alle ungebundenen Cytokine zu
45 entfernen. Die Zellen wurden anschließend in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml resuspendiert. Lebensfähi-
g Zellen wurden in regelmäßigen Intervallen durch Trypanblau-Farbstoff-Ausschlußtest gemessen, und die
Zellproliferation wurde berechnet.

Es konnte gezeigt werden, daß es bei der Herstellung von LCM ohne weiteres möglich ist, PBMC in einem
mengenmäßigen Bereich von 10^5 – 10^7 Zellen/ml einzusetzen und mit einer Kombination von 10–500 IU/ml
50 IL-2 und 10–50% LCM zu inkubieren.

3b. Variation

In Abwandlung der oben genannten Vorschrift kann IL-2 auch dem LCM bereits vor dem Einfrieren zugege-
55 ben werden, was die oben und im folgenden beschriebenen Ergebnisse nicht beeinflußt.

4. Herstellung von SHAK-Zellen in der klinischen Anwendung

Im Rahmen der klinischen Anwendung hat sich folgende Vorgehensweise zur Herstellung eines Arzneimittels
60 zur Krebstherapie bewährt:

i) Herstellung des LCM:

- Einen OKT-3 Monoklonaler Antikörper (Ortho Diagnostik System) mit physiologischer Kochsalzlösung
(0,9% NaCl) auf eine Endkonzentration von 1 $\mu g/ml$ einstellen.
- 65 – Eine Gewebekulturflasche mit Kulturfläche von 175 cm^2 mit 250 ml OKT-3/NaCl-Lösung für 18 Stunden
bei 4°C oder 20°C inkubieren (Coating).
- Nach der Inkubationszeit die Gewebekulturflasche mit 0,9% NaCl-Lösung überschüssiges OKT-3 Anti-
körper auswaschen.

— Periphere m nonukleäre Blutzellen von Patienten über einen Ficoll-Hypaque-Gradienten gewinnen und in einer Endkonzentration von 1 Million Zellen/ml mit 250 ml RPMI-1640 Medium/HA (500 ml RPMI-1640 plus 100 ml 20% Humanalbumin) in die OKT-3 gecoatete Kulturflasche geben. Für 3 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubieren. (Anstelle v n RPMI-1640/Humanalbumin sind auch andere vollständige Kulturmedien mit Humanalbumin geeignet).

— Nach 3 Tagen den Kulturüberstand ernten und reinigen. Die Zellen durch Zentrifugation von dem Kulturüberstand trennen

1. Zentrifugation bei 1000 U/Min.

2. Zentrifugation bei 2000 U/Min.

3. Zentrifugation bei 3000 U/Min.

— Den Überstand, das LCM, zu je 50 ml portionieren und bei -76°C einfrieren.

ii) Herstellung der SHAK-Zellen:

Blutkonservenbeutel mit

CPDA-1 Stabilisator/45 ml

Heparin-Novo/3000 i.E.

rek. Interleukin 2/180 000 i.E.

heparin. periph. Blut d. Patienten/30 ml,

Zugabe von autologem LCM/25 ml.

Vor der Verabreichung für 4 Stunden bei 37°C auf einem Horizontalschüttler bei 100 U/Min. inkubieren.

5. Cytotoxizitätsassay

Die cytotoxische Aktivität der SHAK-Zellen gegenüber autologem Tumor und der chronisch myelogenen Leukämie-Zelllinie K562 wurde unter Verwendung eines bis-Carboxyethyl-Carboxyfluorescein (BCECF) Fluoreszenzfarbstoff Retentionsassays bei einem Effektor-Ziel-Verhältnis von 50 : 1 nach bekanntem Verfahren (M.A. Kolber et al., J. Immunol. Methods 108 (1988) 255—264) durchgeführt.

6. Immunophänotypische Analyse

Zu immunophänotypischen Analysen wurde ein modifiziertes alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase (APAAP)-Verfahren verwendet (J.L. Cordell et al., J. Histochem. Cytochem. 32 (1984) 219—229; A. Körfer et al., Acta Hematol. 82 (1990) 193—196). Cytozentrifugenabstriche wurden von den Kulturzellen 4 Stunden und 24 Stunden nach der Stimulation hergestellt, an der Luft getrocknet und bei -20°C gelagert. Bei allen Patienten wurden gegen CD3, CD8, CD25 und CD56 gerichtete monoklonale Antikörper [alle außer gegen CD56 (dieser von Becton-Dickinson, Mountainview, California, USA) von Dakopatts, Kopenhagen, DK] verwendet. Zusätzliche Zellabstriche wurden für einen May-Gruenwald-Giemsa gefärbt.

7. Nachweis und semiquantitative Beurteilung der Cytokin-Genexpression von SHAKs unter Verwendung einer Reverse Transkriptase-PCR-vermittelten Amplifikation

Die gesamte zelluläre RNA (von 1×10^6 Zellen) wurde unter Verwendung der RNA-zol A-Methode (Cinna Biotech, Houston, Texas, USA) isoliert (P. Chomczynski et al., Anal. Biochem. 162 (1987) 156—159). cDNA wurde unter Verwendung von zufallsverteilten Hexamer-Primern (pdN₆) und von Maloney-muriner Leukämie-Virus Reverser Transkriptase (M-MLV-RT-synthetisiert). Die Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) wurde nach bekanntem Muster durchgeführt (R.K. Saiki et al., Science 230 (1985) 1350—1354; R.K. Saiki et al., Science 239 (1988) 487—491). Die Primer-Sequenzen sind in Tabelle I aufgeführt. Reaktionen in der Größenordnung von 50 µl, die 1 µl cDNA-Lösung (entsprechend einem RNA-Gehalt von ca. 6000 Zellen) wurden 20 bis 40 Amplifikationszyklen (94°C für 90 Sekunden, 58°C (GM-CSF: 72°C) für 90 Sekunden, 72°C für 90 Sekunden) unterzogen.

Zur semiquantitativen Beurteilung der mRNA-Transkript-Level wurde der Nachweisgrad während der PCR bestimmt, indem vom 20. bis 40. Zyklus nach jedem 4. Zyklus gleiche Mengen nach dem 72°C-Polymerisations-schritt entnommen wurden. Während der Probenentnahme wurde das Thermozyklus-Programm bei einer konstanten Temperatur von 72°C gestoppt. Die Aliquote wurden einer Standard-Agarose-Gelelektrophorese (NoSieve agarose 3% in 0,5 × TBE Elektrophoresepuffer, 5 V/cm) unterzogen, und die Banden wurden durch Ethidiumbromidfärbung identifiziert. Der Nachweisgrad entspricht der minimalen Zahl von PCR-Zyklen, die für eine markierte Bande notwendig sind. Um die Vergleichbarkeit individueller Proben beurteilen zu können, wurden β-Actin-Transkripte als interner Standard verwendet. Alle Proben zeigten nach 24 Zyklen vergleichbare β-Actin-Level und kein Signal nach 20 Zyklen. Während der Kultivierung wurde keine Induktion beobachtet.

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, daß das oben beschriebene Verfahren Templat-Konzentrationen unterscheiden kann, die um einen Faktor von 10 differieren, was 4 PCR-Zyklen (im Bereich des 20. bis 40. Zyklus) entspricht. Der untere Schwellenwert der Sensitivität lag bei 10 Kopien pro PCR-Reaktion. Die Reproduzierbarkeit für ein positives Ergebnis lag nach 32 Zyklen bei über 95%. Dies entsprach, wie durch Dilutionsexperimente unter Verwendung von cDNA-Plasmiden bestimmt wurde, einem Nachweis von 1000 bzw. 100 Templat-Kopien pro PCR-Reaktion.

8. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Die Cytokin-Protein-Anteile wurden unter Verwendung der folgenden Cytokin-ELISA Assay-Kits bestimmt:

IL-1 β (Immunotec, Marseille, FR); IL-2, IL-6, INF- γ , TNF- α , TNF- β , G-CSF und GM-CSF (alle von Medgenix, Ratingen, DE); IL-1 α , IL-3 und IL-8 (alle von Quantikine, R+D Systems, Minneapolis, MN, USA); sIL-2R (Boehringer Mannheim, Mannheim, DE). Der untere Sensitivitätsgrenzwert kann Tabelle II entnommen werden. Normale Donor-Seren wurden von der Firma BIOSPA, Hamburg (DE) erhalten. Die relativen Verhältnisse der Cytokin-Konzentrationen des LCM und gesunder Donorseren wurden aus den absoluten Meßergebnissen berechnet.

9. Statistische Analysen

Zur Beurteilung der statistischen Signifikanz wurden der zweiseitig ungepaarte T-Test ("two-sided Student's unpaired t-test") und der Wilcoxon-Zweiprobentest durchgeführt. Alle dargestellten Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben, es sei denn, daß ausdrücklich etwas anderes angegeben ist.

B. Ergebnisse

1. Cytokin-Gehalt des LCM

Zur Charakterisierung des LCM wurden die Cytokin-Proteinanteile in Kulturüberständen von jeweils mindestens 4 Patienten (bzw. 6 Patienten für IL-2, vgl. Tabelle II) mittels ELISA analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt. Die Cytokine wurden in einem Anteil nachgewiesen, der um einen Faktor von 30 (für IL-3) und 7000 (IL-6) über gesunden Donor-Seren lagen. IL-2 war das einzige getestete Cytokin, das im LCM nicht in signifikanten Mengen induziert wurde (< 1 IU/ml). Gegenüber dem Vergleichswert wurden die IL-2-Rezeptoren um einen Faktor 4 stärker induziert.

2. SHAK-Morphologie

Die durch Inkubation von Vollblut mit LCM in Gegenwart von rIL-2 induzierten SHAK-Zellen nahmen die Morphologie aktivierter transformierter Lymphozyten an, die geringfügig vergrößerte runde Kerne mit einem oder mehreren Nucleoli und reichlich, bizarr geformtes blaugrünes Cytoplasma mit mehreren leuchtend rotviolettten Granula aufwiesen.

3. Expression des CD25 Interleukin-2-Rezeptors

Nach der Kurzzeit-Aktivierung von Vollblut in LCM in Gegenwart von IL-2 erwarben 25% \pm 4% der Killer-Zellen das CD25 IL-2-Rezeptor-Molekül. Im Gegensatz dazu induzierten sowohl LCM als auch IL-2 alleine nach vierstündiger Inkubationsdauer in Kultur keinen signifikanten Anteil CD25 positiver SHAK-Zellen.

4. Anti-Tumor-Immunität von SHAK-Zellen

Die Kombination von LCM und IL-2 induzierte eine signifikante Immunität gegenüber autologem Tumor, nicht aber gegenüber autologen PBMC (vgl. Fig. 1). Nach Induktion der SHAK-Zellen in LCM in Gegenwart von IL-2 wurden 54% \pm 7% der autologen Nierzellkarzinom-Zielzellen lysiert, verglichen mit 23% \pm 6% in LCM ($p < 0,002$) und 18% \pm 5% in Gegenwart von IL-2 ($p < 0,002$) alleine. Ähnliche Ergebnisse wurden gegenüber HLA-unrestringierten K562-Tumorzellen erhalten. Die höchste Cytotoxizität der SHAK-Zellen trat 24 Stunden nach Beginn der Kultivierung in LCM in Gegenwart von IL-2 auf und war um einen Faktor von 5,4 höher als die unmittelbar am Ende der 4-stündigen Kulturdauer beobachtete Cytotoxizität.

5. mRNA-Expression und Sekretion sekundärer Cytokine durch SHAK-Zellen

Die Kombination von LCM und IL-2 induzierte durchweg eine erhöhte Expression und Sekretion von IL-2, GM-CSF, INF- γ und TNF- α durch SHAK-Zellen.

Die Expression von IL-2, INF- γ und TNF- α als Antwort auf die LCM/IL-2-Kombination erreichte nach 4 Stunden ein Plateau und war beträchtlich stärker als die nur durch IL-2 induzierte Expression.

Demgegenüber führten bei GM-CSF sowohl die Kombination von LCM und IL-2 als auch die Verwendung von IL-2 alleine zur gleichen mRNA-Expression, wobei nach 8 Stunden ein Plateau erreicht wurde.

Unter Einsatz von LCM in Gegenwart von IL-2 war die mRNA-Expression von INF- γ und TNF- α am Plateau etwa 100fach stärker (24 gegenüber 32 Zyklen) als die Expression von IL-2 und GM-CSF, für die keine konstitutive Expression nachgewiesen wurde. Die Kombination von LCM und IL-2 führte zu einer sekundären Sekretion von INF- γ und TNF- α , die um einen Faktor von 87 bzw. 10,7 stärker war als durch IL-2 alleine, wobei Maximalwerte von 11 070 IU/ml für INF- γ (Ausgangswert 40 IU/ml) und 26400 pg/ml für TNF- α (Ausgangswert 2470 pg/ml) nach 48 bzw. 24 Stunden erreicht wurden. Die höchste INF- γ -Sekretion als Antwort auf die LCM/IL-2-Kombination war um einen Faktor von 2,7 höher als die nur durch LCM induzierte Sekretion.

Die Sekretion von IL-2 und GM-CSF als Antwort auf eine SHAK-Stimulation mit LCM/IL-2 lag durchweg innerhalb der jeweils durch LCM und IL-2 alleine induzierten Sekretion und erreichte ein Maximum von 135 IU/ml (Ausgangswert 100 IU/ml) und 1160 pg/ml (Ausgangswert 250 pg/ml) nach 24 bzw. 48 Stunden.

6. Sicherheit und Toleranz der SHAK-Zellen

Eine Zusammenfassung der toxischen Effekte ist in Tabelle III dargestellt. Sowohl Sicherheit als auch Toleranz der SHAK-Zellen waren sehr gut, und die Behandlung konnte stets ambulant durchgeführt werden. Drei Patienten entwickelten Grad I bzw. II-Fieber und Schüttelfrost, die ungefähr 30 bis 60 Minuten nach Transfusion auftraten und spontan abklangen. Vorübergehende und leichte Atemnot, Übelkeit und Erbrechen wurden jeweils bei zwei Patienten beobachtet. Ferner entwickelte ein Patient eine Grad I-Hypotonie. Die systemische Toxizität ging nicht mit kapillärem Leck und/oder Flüssigkeitseinlagerungen in der Lunge einher. Zu toxischen Todesfällen kam es nicht.

7. Klinische Effizienz der SHAK-Zellen

Alle Patienten wurden zur Dokumentierung des Therapie-Ansprechens überwacht. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV dargestellt. Bei einem Patienten kam es zu einer partiellen Remission im Bereich des Rumorlokalrezidivs sowie abdomineller Metastasen, bei fünf Patienten stabilisierte sich die Krankheit (im Bereich von Lokalrezidiv, pulmonären und mediastinalen Metastasen), und bei zwei Patienten trat ein Krankheitsprogred auf. Das mediane progressionsfreie Intervall betrug 3 Monate (0 bis über 8 Monate). Bei drei von sechs behandelten Patienten, bei denen die Therapie ansprach, hatten zuvor je mindestens drei systemische Therapien – einschließlich der Gabe von INF- α bzw. von IL-2/INF- α -Kombinationen – keinen Erfolg gehabt. Unter den auf die Therapie ansprechenden Patienten gehörten zwei Patienten in die Kategorie mit geringem Risiko, sie wiesen eine mediane Überlebenszeit von mehr als 11,5 Monaten (über 10 bis über 13 Monaten) auf, und zusätzlich vier Patienten gehörten der mittleren Risikogruppe an mit einer medianen Überlebenszeit von mehr als 9,5 Monaten (4 bis über 14 Monate). Die Gesamtüberlebenszeit vom Beginn der Therapie an betrug bei allen Patienten zwischen 2 und über 14 Monaten mit einer medianen Überlebenszeit von mehr als 9 Monaten.

Tabelle I

Oligonukleotide von 5'-Primern und 3'-Primern untersuchter Zielgene

Primer ^a	Sequenz (5'→3')	Größe des PCR-Produkts [bp]
β -Actin	5' ATG GAT GAT GAT ATC GCC GCG 3' TCT CCA TGT CGT CCC AGT TG	248
IL-2	5' ATG TAC AGG ATG CAA CTC CTG TCT T 3' GTT AGT GTT GAG ATG ATG CTT TGA C	458
GM-CSF	5' ATG TGG CTG CAG AGC CTG CTG C 3' CTG GCT CTT CGA CCT CGA AAC AGC AT	424
INF- γ	5' ATG AAA TAT ACA AGT TAT ATC TTG GC TT 3' GAT GCT CTT CGA CCT CGA AAC AGC AT	494
TNF- α	5' CAG AGG GAA GAG TTC CCC AG 3' CCT TGG TCT GGT AGG AGA CG	325

^a β -Actin²⁴, IL-2²⁵, GM-CSF²⁶, INF- γ ²⁷, TNF- α ²⁸⁻²⁹.

Tabelle II

Cytokin-Protein-Anteile des "lymphocyte conditioned medium" (LCM)^a

n = 4 Patienten

Cytokine	Mittelwert (Bereich)	Index ^b	Unterer Sensitivitätswert
IL-1 α [pg/ml]	1664 (340 - 2279)	400	0.3
IL-1 β [IU/ml]	5238 (465 - 7761)	1×10^3	5
IL-2 ^c [IU/ml]	< 1 (0 - 1)	-	0.1
sIL-2R [pmol/ml]	242 (65 - 475)	4	5
IL-3 [pg/ml]	143 (156 - 409)	30	7.4
IL-5 [pg/ml]	41559 (14854 - 84878)	7×10^3	3
IL-8 [pg/ml]	516750 (377000 - 587000)	2×10^3	18.1
INF- γ [IU/ml]	808 (172 - 2462)	4×10^3	0.03
TNF- α [pg/ml]	18052 (5538 - 35913)	3×10^3	3
TNF- β [pg/ml]	1356 (127 - 4004)	300	7
G-CSF [pg/ml]	1824 (480 - 2974)	90	10.9
GM-CSF [pg/ml]	2580 (1843 - 4293)	360	3

^a LCM wurde durch Inkubation autologer peripherer mononukleärer Blutzellen in Gegenwart von OKT-3 erhalten. Der Kulturüberstand wurde nach 72 h geerntet, ultrafiltriert und bei -75°C gelagert. LCM wurde anschließend zur Bestimmung der Konzentrationen verschiedener Cytokine analysiert.

^b Verhältnis der Cytokin-Konzentrationen im LCM und in gesunden Donor-Seren.

^c n = 6 Patienten.

Tabelle III

Toxizität	WHO Grad I / II	Grad III / IV	
Fieber / Unwohlsein	3 *	0	5
Schüttelfrost	3	0	10
Übelkeit und Erbrechen	2	0	
Atemnot	2	0	15
Hypotonie	1	0	
Flüssigkeitseinlagerung	0	0	20

* Anzahl der Patienten 25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabelle IV

Patientendaten und Ansprechen auf die Therapie							
Patient ^a	Geschl./Alter	Orte der Metastasen	Systemische Vorbehandlung	Risiko ^b	SHAK Transfusionen	Ansprechen ^c	Überlebenszeit ^d
1	m/42 Jahre	Lunge (synchron.), Mediastinum	-	gering	8	SD	13+ Monate
2	m/39	Lunge (synchron.)	rIL-2/rINF-α/5-FU, rINF-α/Velban, Tamoxifen	mittel	18	PD	4
3	m/65	Lunge (synchron.)	-	mittel	8	SD	11
4	w/59	Abdomen, lokaler Rückfall	Tamoxifen, rIL-2/rINF-α, rINF-α/Velban, rINF-α/5-FU, MPA	mittel	6	PR	14+
5	w/52	Lunge (synchron.), lokaler Rückfall	rIL-2/rINF-α, rINF-α/5-FU-α Velban	mittel	8	SD	4
6	w/57	Lunge	-	gering	8	SD	10+
7	m/66	Lunge (synchron.), Mediastinum	-	hoch	8	PD	2
8	m/43	Lunge	rIL-2/rINF-α, rINF-α/Velban, rINF-α	mittel	11	SD	8+

^a Alle Patienten befanden sich vor der SHAK-Therapie in fortgeschrittenen Krankheitsstadien.
^b Das Risiko wurde unter Anwendung einer Multivariatanalyse ("multivariate Cox proportional hazards regression model") auf der Basis von 279 behandelten Patienten mit metastasierenden Nierenzellkarzinomen bestimmt.
^c Die mediane Ansprechzeit betrug 3 Monate mit einem Bereich von 0 bis 8+ Monaten.
^d Die Gesamtüberlebenszeit wurde vom Therapiebeginn an bestimmt.

Beschreibung der Figuren

Fig. 1 Cytotoxizität der SHAK gegenüber spezifischen und unspezifischen Zielen:

Bei acht Patienten wurde die Cytotoxizität gegenüber autologem Tumor, autologen peripheren mononukleären Blutzellen und gegenüber der Zelllinie K562 gemessen. Die Werte wurden mit der durch IL-2 bzw. IL-2/LCM induzierten Cytotoxizität peripherer mononukleärer Blutzellen verglichen. 5

Fig. 2a/2b Expression und Sekretion sekundärer Cytokine durch SHAK:

Die durch die LCM/IL-2-Kombination erzeugten SHAK wurden mit patienteneigenen peripheren mononukleären Blutzellen verglichen, die mit IL-2, mit LCM bzw. mit Phorbolmyrestatacetat (PMA) oder in Gegenwart des chemischen Calcium-Induktors Ionophor A23187 aktiviert worden waren. Die mRNA-Expression (PCR) und Cytokin-Sekretion (ELISA) von IL-2, GM-CSF, IFN- γ und TNF- α wurde vor Stimulation und zu verschiedenen definierten Zeitpunkten danach gemessen. 10

Patentansprüche

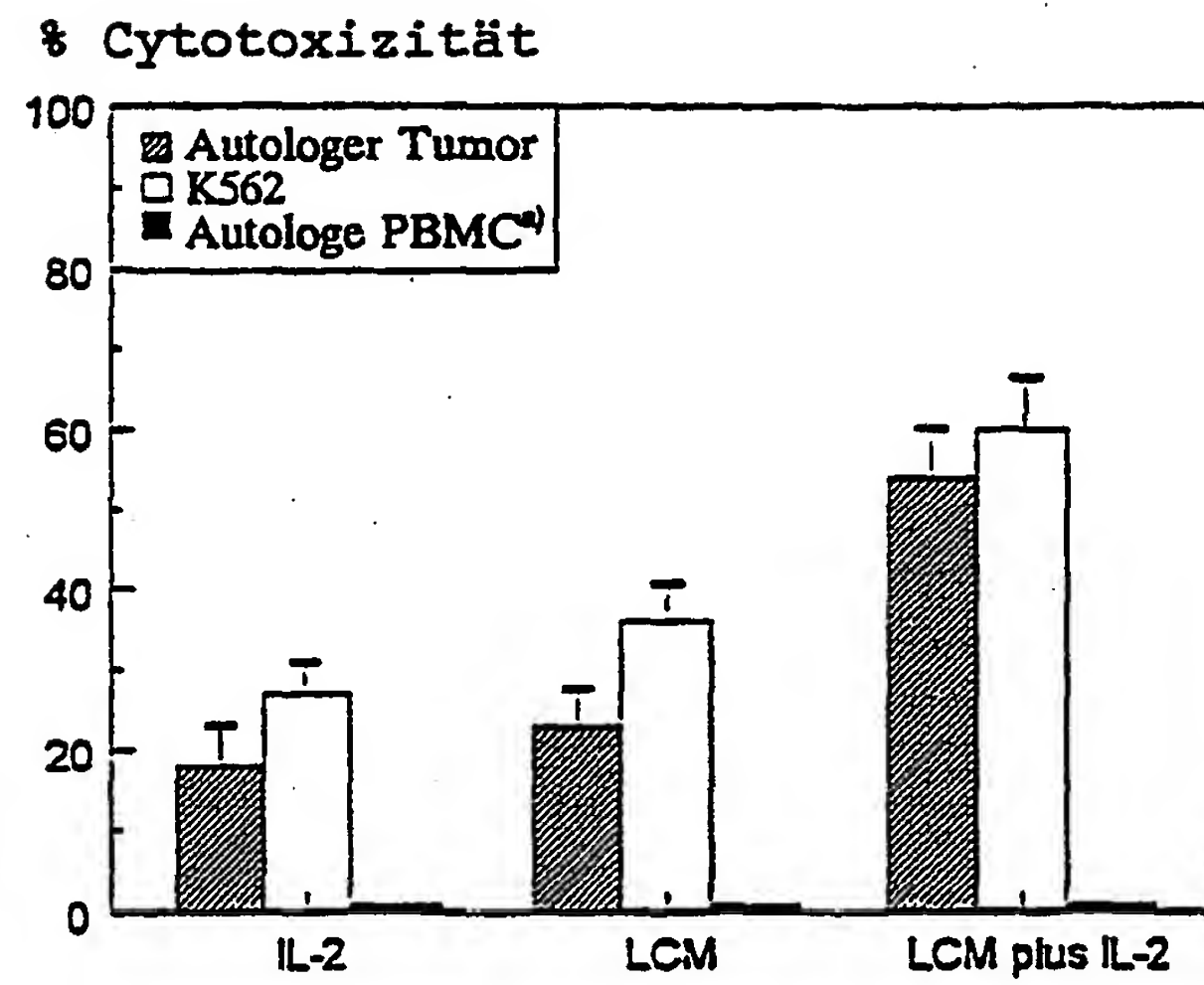
1. Multi-Cytokin-Mischung, erhalten durch: 15
 - a) Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen aus humanem Vollblut,
 - b) Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper OKT3 und
 - c) Isolierung des Kulturüberstandes und
 - d) Zugabe von Interleukin-2 (IL-2) zum Kulturüberstand. 20
2. Multi-Cytokin-Mischung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Mischung rekombinant hergestelltes IL-2 enthält.
3. Multi-Cytokin-Mischung nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie weitere Cytokine aus der Gruppe bestehend aus Tumor-Nekrose-Faktoren, Interleukinen, Interferonen und Kolonie-stimulierenden Faktoren enthält. 25
4. Multi-Cytokin-Mischung nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie in tiefgefrorenem Zustand vorliegt.
5. Multi-Cytokin-Mischung nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie in gefriergetrocknetem Zustand vorliegt.
6. Verfahren zur Herstellung einer Multi-Cytokin-Mischung, bei dem aus humanem Vollblut isolierte 30
 periphere mononukleäre Blutzellen mit dem monoklonalen Antikörper OKT3 inkubiert werden und der Kulturüberstand isoliert wird, dadurch gekennzeichnet, daß man dem Kulturüberstand IL-2 zusetzt.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß man rekombinant hergestelltes IL-2 zusetzt.
8. Verfahren nach den Ansprüchen 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß man der Mischung weitere Cytokine aus der Gruppe bestehend aus Tumor-Nekrose-Faktoren, Interleukinen, Interferonen und Kolo- 35
 nie-stimulierenden Faktoren zusetzt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man die Mischung tieffriert.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man die Mischung gefrier-
 trocknet.
11. Verwendung der Multi-Cytokin-Mischung nach den Ansprüchen 1 bis 5 zur Herstellung eines Arznei- 40
 mittels zur Behandlung maligner Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß man die Mischung mit Vollblut des zu behandelnden Patienten inkubiert und gegebenenfalls mit geeigneten pharmazeutischen Hilfs- und Trägerstoffen versetzt.
12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man die Mischung mit aus dem Vollblut 45
 des zu behandelnden Patienten isolierten peripheren mononukleären Blutzellen inkubiert.
13. Arzneimittel zur Behandlung maligner Erkrankungen enthaltend eine Multi-Cytokin-Mischung nach einem der Ansprüche 1 bis 5 in Kombination mit Vollblut des zu behandelnden Patienten sowie gegebenen-
 falls geeigneten pharmazeutischen Hilfs- und Trägerstoffen, wobei die Multi-Cytokin-Mischung mit dem 50
 Vollblut inkubiert wurde.
14. Arzneimittel nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß es anstelle des Vollblutes aus dem Vollblut 50
 des zu behandelnden Patienten isolierte periphere mononukleäre Blutzellen enthält.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

55

60

65



a) PBMC = periphere mononukleäre Blutzellen

Fig-1

Fig-2a

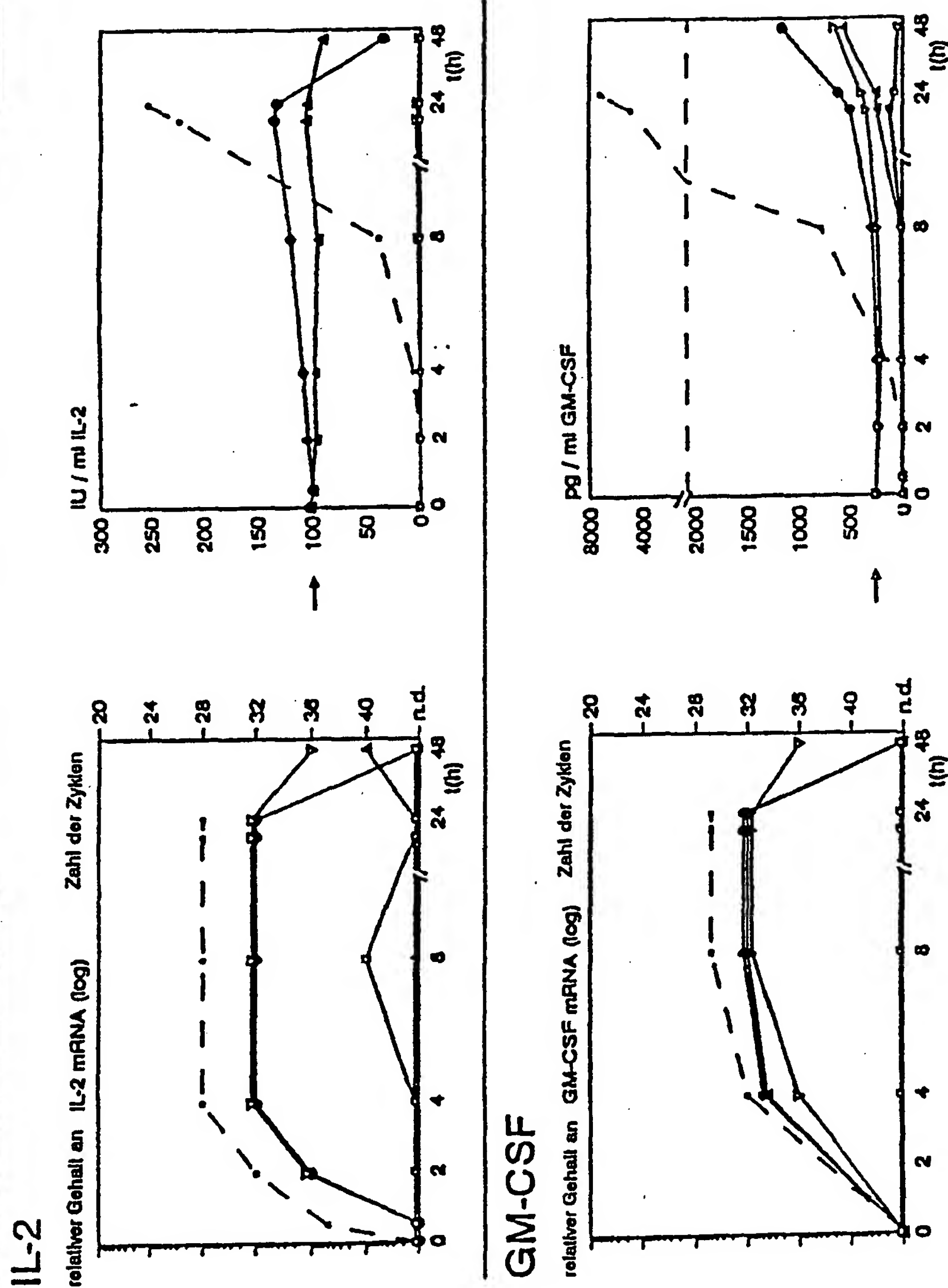


Fig-2b

